

ISPH-0771



RISF 0357 BB

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C12N 15/11, A61K 31/7125, C12N 15/86 // A61P 9/10	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/66725 (43) Date de publication internationale: 9 novembre 2000 (09.11.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/01191 (22) Date de dépôt international: 3 mai 2000 (03.05.00) (30) Données relatives à la priorité: 99/05629 4 mai 1999 (04.05.99) FR 60/139,735 18 juin 1999 (18.06.99) US (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): AVEN- TIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20 Avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): PARMENTIER, So- phie [FR/FR]; 14 Château-Bois, F-62131 Vaudricourt (FR). BOHME, Andrees [DE/FR]; 32 Rue Vitruve, F-75020 Paris (FR). PLOTKINE, Michel [FR/FR]; 6 Avenue Suzanne, F-94130 Nogent-sur-Mame (FR). (74) Mandataire: BOUVET, Philippe; Aventis Pharma S.A., Direc- tion Brevets, 20 Avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR).		(81) Etats désignés: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des</i> <i>revendications, sera republiée si des modifications sont</i> <i>reçues.</i>
(54) Title: USE OF INDUCIBLE NO-SYNTHASE ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES FOR PREVENTING AND TREATING CEREBRAL ISCHEMIA (54) Titre: UTILISATION D'OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS DE NO-SYNTHASE INDUCTIBLE DANS LA PREVENTION ET LE TRAITEMENT DE L'ISCHEMIE CEREBRALE (57) Abstract The invention concerns the use of antisense oligonucleotides of an inducible isoform of nitrogen monoxide synthase for preventing and treating cerebral ischemia. The invention also concerns vectors containing a nucleic acid coding for said antisense oligonucleotide sequences and compositions containing them. (57) Abrégé Utilisation d'oligonucléotides antisens d'une isoforme inductible de la synthase du monoxyde d'azote dans la prevention et le traitement de l'ischémie cérébrale. Vecteurs contenant un acide nucléique codant pour les séquences desdits oligonucléotides antisens et compositions les contenant.		

25

1550-4921

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

UTILISATION D'OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS DE NO-SYNTASE
INDUCTIBLE DANS LA PREVENTION ET LE TRAITEMENT DE
L'ISCHEMIE CEREBRALE.

La présente invention concerne le domaine thérapeutique du système nerveux central
5 et plus particulièrement l'utilisation d'oligonucléotides antisens d'une isoforme
inductible de la synthase du monoxyde d'azote (NO-synthase, NOS, EC 1.14.13.39)
dans la prévention et le traitement de l'ischémie cérébrale. L'invention se rapporte
également à des vecteurs contenant un acide nucléique codant pour lesdits
oligonucléotides antisens et compositions les contenant.

10

L'ischémie cérébrale se caractérise par une baisse du débit sanguin cérébral
ayant pour conséquence un déficit en substrats énergétiques indispensables pour le
cerveau (oxygène et glucose).

Les conséquences de l'ischémie dépendent de sa sévérité (intensité de la chute
15 du débit sanguin) et de sa durée. La diminution du débit sanguin entraîne d'important
dysfonctionnements cellulaires dont l'augmentation du calcium cytosolique,
l'activation de nombreuses enzymes à l'origine d'une perte de l'intégrité cellulaire et
la libération d'acides aminés excitateurs tels que le glutamate et l'aspartate,
conduisant à la mort neuronale.

20

A l'heure actuelle, les atteintes ischémiques cérébrales constituent toujours
l'une des principales causes de mortalité et de morbidité, en raison de l'absence de
thérapeutiques efficaces. Les modèles expérimentaux d'ischémie par occlusion de
l'artère cérébrale moyenne (ACM) mis au point chez différentes espèces animales ont
25 permis de révéler l'effet neuroprotecteur des stratégies consistant, soit à bloquer les
différents types de récepteurs glutamatergiques, soit à inhiber la libération de
glutamate.

Cependant, il a été décrit par Margaill *et al.* (1996) que les stratégies
"anti-glutamate", efficaces dans les modèles d'ischémie focale permanente, ne
30 présentent qu'une fenêtre d'opportunité thérapeutique étroite dans certains modèles
d'ischémie focale transitoire. Ceci pouvant être à l'origine des difficultés actuelles à
mettre en évidence une activité de ces traitements "antiglutamate" au cours d'essais
cliniques.

Par ailleurs, Margaiil *et al.* (1997) ont démontré qu'une stratégie visant à inhiber la production de monoxyde d'azote (NO) conserve une activité protectrice même lorsque le traitement est instauré 9 heures après l'ischémie. Cette fenêtre d'opportunité thérapeutique, considérablement supérieure à celle observée à la suite de l'administration d'agents agissant sur le glutamate, a incité à poursuivre l'exploration des mécanismes tardifs survenant à la suite d'une ischémie. En effet, on peut faire l'hypothèse qu'une stratégie thérapeutique visant à s'opposer à un phénomène délétère tardif pourrait avoir un intérêt clinique supérieur à celui des stratégies "anti-glutamate".

10

Le rôle délétère de la NO-synthase et en particulier d'une isoforme inductible de cette enzyme a été établi dans des modèles d'ischémie focale permanente et transitoire grâce à l'utilisation d'animaux transgéniques chez lesquels un gène codant pour une NOS inductible a été invalidé (Iadecola *et al.*, 1997) ou de substances pharmacologiques inhibitrices de NOS inductible (Parmentier *et al.*, 1999).

15

L'effet d'oligonucléotides antisens de NOS inductible a déjà été étudié dans le cas de l'ischémie rénale (Noiri *et al.*, 1996). Les résultats de ces études démontrent une atténuation des dysfonctionnements des reins chez des rats sujets à des ischémie expérimentales de ces organes et une amélioration de la viabilité des cellules épithéliales rénales (Peresleni *et al.*, 1996).

20

L'effet d'oligonucléotides antisens de NOS inductible a été également étudié dans le cas d'une affection du système nerveux à caractère immunitaire telle que la sclérose en plaque (Ding *et al.*, 1998). Les résultats de cette étude démontrent l'inhibition de l'induction d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale chez la souris.

25

Bien que des études aient été menées avec des antisens, il n'en demeure pas moins qu'aucune étude n'a utilisé cette stratégie pour bloquer spécifiquement la synthèse de NO-synthase inductible et démontrer le rôle bénéfique de cette inhibition dans l'ischémie cérébrale.

30

La demanderesse a maintenant démontré un effet thérapeutique surprenant de protection de cellules bien particulières, les cellules nerveuses, dans une affection du système nerveux à caractère métabolique comme l'ischémie cérébrale par l'administration d'oligonucléotides antisens.

35

La présente invention se rapporte donc à l'utilisation d'oligonucléotides antisens d'une isoforme inductible de la NO-synthase pour la protection des cellules nerveuses envers les effets délétères de la surproduction de monoxyde d'azote lors d'une ischémie cérébrale. En particulier, l'invention concerne l'utilisation d'oligonucléotides antisens d'une isoforme inductible de NO-synthase pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et la traitement de ischémie cérébrale .

On distingue classiquement deux groupes de NO synthase. Les NO synthases dites "constitutives" (cNOs) sont présentes à l'état physiologique et calmoduline dépendantes. Ces enzymes produisent le monoxyde d'azote (NO) pendant de courtes périodes (Bredt et Snyder, 1990 ; Försterman *et al.*, 1991). Ce NO intervient comme médiateur dans de nombreux processus physiologiques tels que la vasodilatation et la neurotransmission. Par des techniques de purification puis de clonage, il a ainsi été identifié une isoforme constitutive neuronale de NO-synthase (Bredt *et al.*, 1991) et une isoforme constitutive endothéliale de NO-synthase (Lamas *et al.*, 1992).

Les NO synthases inductibles (iNOs) ne sont généralement pas présentes à l'état physiologique mais sont induites à la suite d'une stimulation par des messagers biologiques telles que des cytokines comme l'interféron-gamma ou l'interleukine-1, ou des produits bactériens comme des lipopolysaccharides. Ces enzymes produisent le NO en grande quantité et sur de longues périodes et leur activation est calmoduline-indépendante. Le NO produit joue un rôle délétère dans divers processus physiopathologiques. Une NO-synthase inductible a été clonée à partir de macrophages de souris (Xie *et al.*, 1992). Il a ensuite été démontré qu'une activité NO-synthase pouvait aussi être induite dans un grand nombre de type cellulaires tels que les cellules musculaires lisses, les hépatocytes, les cardiomyocytes, les neutrophiles, la microglie, les astrocytes, les chondrocytes (Nathan, 1992) et également les neurones (Minc-Golomb *et al.*, 1992).

Ainsi, dans le cadre de l'invention, la NO-synthase à l'encontre de l'expression de laquelle les oligonucléotides de l'invention sont utilisés est de manière préférée une NO synthase inductible (iNOs) ou également appelée de type 2.

Les oligonucléotides antisens selon l'invention constituent des séquences antisens des ARN messagers de tout ou partie de l'enzyme NO synthase. Comme cela a été décrit précédemment, les oligonucléotides antisens de l'invention sont de manière préférée dirigés contre tout ou partie d'une NO-synthase inductible.

5

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, la séquence des oligonucléotides antisens selon l'invention correspond à la séquence SEQ ID N° 1 ou l'une des séquences dérivées.

10 Selon une variante de l'invention, la séquence des l'oligonucléotides antisens correspond à la séquence SEQ ID N° 2 ou l'une des séquences dérivées.

Par séquence dérivée, on entend toute séquence obtenue par modification et codant pour un produit conservant la propriété d'inhiber la synthèse d'une isoforme inductible de la NO-synthase. Cette séquence dérivée partage en outre 90 % et
15 préférentiellement 80 % d'homologie avec la séquence native.

Par modification, on entend toute mutation, délétion, substitution addition ou modification de nature génétique et/ou chimique. Ces modifications peuvent être réalisées par des techniques connues de l'homme du métier.

20 Ces dérivés peuvent notamment être des molécules ayant une grande affinité pour leurs sites de fixation, des séquences permettant une expression améliorée *in vivo*, des molécules présentant une plus grande résistance aux protéases, des molécules ayant une efficacité thérapeutique plus grande.

25 Parmi les dérivés préférés, on peut citer plus particulièrement les variants naturels, les molécules dans lesquelles un ou plusieurs résidus ont été substitués, les dérivés comportant par rapport à la séquence native des résidus supplémentaires tels que par exemple des signaux de sécrétions et/ ou de jonction.

30 La séquence de l'oligonucléotide antisens telle que décrite précédemment comprend entre 10 et 30 mers et préférentiellement entre 15 et 25 mers.

Un autre objet de l'invention est relatif à un vecteur comprenant dans son génome un acide nucléique codant pour l'oligonucléotide antisens selon l'invention.

Le vecteur de l'invention peut être par exemple un plasmide, un cosmide ou tout ADN encapsulé par un virus, un phage, un chromosome artificiel, un virus recombinant....Il s'agit de préférence d'un plasmide ou d'un virus recombinant.

- 5 A titre de vecteurs viraux conformes à l'invention, on peut tout particulièrement citer les vecteurs de type adenovirus, les rétrovirus, les virus adéno-associés, le virus de l'herpès ou le virus de la vaccine ainsi que les baculovirus.

- 10 Selon un mode préféré de l'invention le vecteur viral est déficient c'est-à-dire dépourvu des séquences nécessaires à sa répllication autonome dans les cellules cibles. L'obtention de vecteurs viraux déficients tels que ceux mentionnés précédemment est maintenant bien connue de l'homme du métier.

- 15 Généralement, la séquence d'acide nucléique comprend une région promotrice de la transcription fonctionnelle. Il peut s'agir d'une région promotrice de gènes eucaryotes ou viraux.

- Par ailleurs, le vecteur peut comporter dans son génome, en particulier en amont de la séquence d'acide nucléique codant pour l'oligonucléotide selon l'invention, une séquence signal dirigeant le produit synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être une séquence signal naturelle ou une séquence signal artificielle.

- 20 Le vecteur selon l'invention peut être utilisé aussi bien dans une approche *ex vivo* ou *in vivo*. Dans le cadre d'une thérapie génique applicable à l'homme, on peut envisager une approche *ex vivo* par greffe de cellules modifiées génétiquement par un vecteur décrit ci-dessus. Ces cellules peuvent être d'origines diverses: par exemple nerveuses (humaines ou non humaines). L'association de certains médicaments peut être envisagée en vue notamment de d'améliorer le maintien de la greffe ou l'expression du transgène (immunosuppresseurs, anti-complément...). On peut aussi envisager l'implantation de cellules génétiquement modifiées par un vecteur de l'invention après encapsidation dans un système inerte.
- 30

Pour leur utilisation selon la présente invention, les oligonucléotides antisens ou le vecteur les contenant sont préférentiellement associés à un ou des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour être formulé en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, stéréotaxique, etc. De préférence, les oligonucléotides antisens ou le vecteur les contenant sont utilisés sous une forme injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les doses de virus utilisées pour l'administration peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du site d'administration considéré, du nombre d'injections, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 15 jours, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

C'est pourquoi un autre objet de l'invention réside dans une composition pharmaceutique comprenant au moins un vecteur viral ou plasmidique comprenant dans son génome un acide nucléique codant pour l'oligonucléotide antisens défini précédemment.

Par ailleurs, un autre objet de l'invention réside dans une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un oligonucléotide antisens d'une isoforme inductible de la NO-synthase pour la protection contre l'ischémie cérébrale.

Un autre objet de l'invention est un médicament comprenant au moins un oligonucléotide antisens d'une isoforme inductible de la synthase du monoxyde d'azote pour la prévention et le traitement de l'ischémie cérébrale.

Un autre objet encore de l'invention se rapporte à l'utilisation d'un vecteur décrit précédemment pour la fabrication d'un médicament destiné à la prévention et le traitement de l'ischémie cérébrale.

- Ainsi, l'invention consiste également en un médicament comprenant au moins
5 un vecteur tel que décrit précédemment et de manière préférée comprenant au moins un vecteur viral ou plasmidique.

LEGENDE DES FIGURES

- 10 **Figure 1** : Réalisation du modèle d'ischémie focale transitoire. Mise en place du dispositif d'occlusion temporaire de l'artère carotide commune (A) et manoeuvre de celui-ci (B).

- 15 **Figure 2** : Réalisation du modèle d'ischémie focale transitoire. Mise en place du dispositif d'occlusion temporaire (microclip) de l'artère cérébrale moyenne.

Figure 3 : Quantification des atteintes histologiques par coloration au triphényle-tétrazolium.

- 20 **Figure 4** : Mise en place du guide pour l'injection intracérébroventriculaire

25 MATERIEL ET METHODES

Toutes les expériences sont réalisées sur des rats mâles Sprague-Dawley (Iffa Credo, France) d'un poids compris entre 300 et 330 grammes.

30 1. ISCHÉMIE CÉRÉBRALE FOCAL TRANSITOIRE

Le modèle d'ischémie focale transitoire pratiqué nécessite une craniectomie afin de dégager l'artère cérébrale moyenne (ACM). L'approche subtemporale que nous utilisons est celle initialement décrite par Tamura *et al.* (1981).

35

1.1. Procédure chirurgicale

1.1.1. Abord chirurgical de l'artère cérébrale moyenne

5 Les rats sont anesthésiés par injection intrapéritonéale (i.p.) d'hydrate de chloral (400 mg/kg sous un volume de 10 ml/kg). L'animal est ensuite placé sur le flanc droit sous une loupe binoculaire (Zeiss). Le scalp est incisé selon un axe partant de l'oreille gauche à l'aide d'un bistouri électrique (ME 80®, Martin). Suivant ce même axe, le muscle temporal est incisé et l'arcade zygomatique retirée. On effectue
10 alors autour *du foramen ovale* une craniectomie de 3 à 4 mm de diamètre à l'aide d'une fraise dentaire (Minigyr®, Anthogyr, France). La dure-mère est incisée afin de dégager l'ACM gauche.

Durant toute la durée de l'opération, la température rectale des animaux est
15 contrôlée à l'aide de sondes thermiques (Digi-Sense®, Cole-Palmer, Chicago, USA) et maintenue à $37,5 \pm 0,5$ °C grâce à une couverture chauffante.

1.1.2. Ischémie focale transitoire

20 Le modèle d'ischémie focale transitoire utilisé consiste à occlure de façon réversible l'ACM gauche à l'aide d'un microclip. A cette occlusion, est associé le clampage de l'artère carotide commune ipsilatérale (ACCi). Pour cela, les rats, anesthésiés par injection intrapéritonéale d'hydrate de chloral (400 mg/kg sous un volume de 10 ml/kg), sont placés en décubitus dorsal. Une incision longitudinale est
25 effectuée dans la région trachéenne, l'ACC est dégagée et isolée du nerf vague à l'aide d'un tube de silicone (Silastic®, réf. 602-7, Sigma), sur lequel est enfilé une pastille d'environ 5 mm de diamètre également en silicone (Silastic®, réf. 500-135, Sigma) préalablement percée de deux trous. Les bouts libres du tube de silicone sont noués comme indiqué dans la figure 1A. L'ACC est ainsi prête pour le clampage qui sera
30 effectué immédiatement après la mise en place du microclip sur l'ACM.

L'approche chirurgicale de l'ACM est celle décrite au paragraphe 1.1.1. Celle-ci est ensuite occluse au niveau de sa partie proximale, en amont de l'artère lenticulo-striée, par un microclip (zen type temporary clip, 15 mm x 0,4 Ohwa
35 Tsusho Co., Ltd Tokyo, Japon) enfoncé perpendiculairement à la surface du cerveau,

à l'aide d'une pince spéciale (zen type clip applier, 15 cm. Ohwa Tsusho Co., Ltd Tokyo, Japon) (Figure 2). L'incision des plans cutanés superficiels est ensuite refermée par une agrafe chirurgicale.

- 5 On effectue enfin le clampage de l'ACC en enfilant sur le tube de silicone un embout bleu de pipette Gilson® (Polylabo) préalablement coupé à ses deux extrémités et fendu dans sa partie supérieure: en tirant sur le fil et en le coinçant dans cette fente, on interrompt la circulation carotidienne (Figure 1B).
- 10 Au terme de la durée d'occlusion souhaitée, les animaux sont à nouveau anesthésiés par l'hydrate de chloral. L'incision est ré-ouverte et le microclip ainsi que le clampage carotidien sont retirés. Les incisions temporale et trachéenne sont alors définitivement refermées à l'aide d'agrafes. Les animaux sont placés dans des enceintes thermostatées à 29°C jusqu'à leur réveil puis remis à l'animalerie jusqu'à
- 15 leur euthanasie. Les animaux, ayant de la difficulté pour mâcher, sont nourris avec des granulés préalablement ramollis dans de l'eau.

1.2. Mesure des variables physiologiques

- 20 Pour la mesure de la pression artérielle moyenne (PA moyenne), la pression partielle en O₂ (pO₂), la pression partielle en CO₂ (pCO₂) et le pH, un cathéter en polyéthylène (Biotrol®, ref. E03403) est introduit dès l'anesthésie des animaux dans l'artère de la queue. Le cathéter est relié à un robinet à trois voies: l'une sert au prélèvement de sang pour l'analyse de la pO₂, de la pCO₂ et du pH par un analyseur
- 25 des gaz du sang (ABL 330, Radiometer®, Copenhagen); l'autre est branchée sur un capteur (EMKA Technologies, Paris), relié à un enregistreur (SEFRAM, Paris), pour la mesure de la PA moyenne.

- 30 Ce dispositif nécessite l'héparinisation des animaux. Une solution d'héparine (solution injectable d'héparine Choay®) à 50 UI/ml de soluté physiologique est préparée. Deux cent microlitres de cette solution sont injectés par le robinet dès la pose du cathéter, puis à chaque prélèvement de sang. Les animaux sont maintenus en normothermie pendant toute la durée des mesures à l'aide d'une couverture chauffante.

35

Trois mesures des variables physiologiques sont effectuées, l'une immédiatement avant le clampage des artères, la seconde 30 minutes après le clampage des artères, enfin la troisième est réalisée 30 minutes après le déclampage des artères. Simultanément, la température rectale des animaux est relevée, afin de vérifier leur normothermie. A la fin de l'expérience, le cathéter est retiré et l'artère de la queue occluse à l'aide d'un fil.

Il faut noter que les animaux sont maintenus anesthésiés durant la mesure des variables physiologiques.

1.3. Mesure du débit sanguin cérébral

La mesure du débit sanguin cérébral est réalisée à l'aide d'un laser-Doppler (Laseflow BPM2(E Vasamedics). Les animaux anesthésiés par une solution d'hydrate de chloral (400 mg/kg sous un volume de 10 ml/kg) sont placés en contention stéréotaxique. La surface du crâne est rasée et une incision est effectuée de manière à dégager le *calvarium*. Un orifice est percé pour permettre l'introduction de la sonde à laser-Doppler dans la région choisie. Le débit sanguin cérébral (DSC) est mesuré dans une zone correspondant à la pénombre de l'infarctus. Les coordonnées de la mesure ont été déterminées à l'aide de l'Atlas Paxinos et Watson (1986):

- Antéro-postériorité: 4,2 mm par rapport à la ligne inter-aurale.

- Latéralité: -3 mm par rapport au bregma.

25

La sonde est placée à la surface du cortex en contact de la dure-mère. La sonde est maintenue au niveau de son site de mesure grâce à un support en polyéthylène collé à l'os du crâne avec une colle de type cyanolit®. L'animal est alors retiré de l'appareil stéréotaxique et on peut commencer la procédure chirurgicale d'ischémie.

30

1.4. Quantification des atteintes fonctionnelles

1.4.1. Perte de poids

5

La perte de poids des animaux est évaluée par la différence entre le poids avant la réalisation de l'ischémie et le poids le jour de l'euthanasie.

1.4.2. Déficit neurologique

10

L'examen neurologique consiste en une évaluation de la présence de différents réflexes et de réactions comportementales.

Les perturbations neurologiques sont évaluées à l'aide des tests suivants:

15

- Le réflexe d'agrippement au niveau de chacune des pattes antérieures.

Score = 1: capable de s'agripper / 0: ne s'agrippe pas.

Total = 1 pour chaque côté.

- Les réactions de placement visuel au niveau de chacune des pattes antérieures.

20

Score = 1: capable de se placer / 0: ne se place pas.

Total = 1 pour chaque côté.

- Les réactions de perte d'appui au niveau de chacune des pattes antérieures et postérieures.

Score = 1: prend son appui / 0: ne prend pas son appui.

25

Total = 2 pour chaque côté.

- Le réflexe de redressement avec le test de rotation.

Score = 1: rotation dans le sens opposé / 0: pas de rotation.

Total = 1 pour chaque côté.

Le score neurologique global est donc pour chaque côté égal à 5.

30

1.5. Quantification des atteintes histologiques

L'euthanasie des rats est réalisée par l'injection d'une dose massive de pentobarbital sodique (120 mg/kg, i.p.) (Sanofi). Leurs cerveaux sont prélevés et
35 coupés en 7 sections coronales de 2 mm d'épaisseurs à l'aide d'une matrice pour

cerveaux de rats. Elles sont prélevées à partir du niveau d'antériorité 13.7 par rapport à la ligne inter-aurale et ceci tous les 2 mm jusqu'au niveau d'antériorité 1,7.

1) Coloration

5

Les coupes fraîchement prélevées sont immergées dans une solution à 2% de chlorhydrate de triphényl-tétrazolium (TTC) (Sigma) pendant 20 minutes à température ambiante. Cette solution entraîne la coloration des zones saines en rose alors que les zones nécrosées ne se colorent pas. Les coupes sont ensuite fixées dans
10 une solution à 4% de paraformaldéhyde (PFA, Sigma) dans un tampon phosphate sodique à 50 mM (pH 7) et placées à l'obscurité. Les surfaces d'infarctus peuvent alors être mesurées 24 heures après la coloration (Figure 3).

2) Quantification des atteintes histologiques

15

Les coupes sont examinées à l'aide d'un système d'analyse d'image (IMSTAR®, Paris, France). Les zones d'infarctus corticales et striatales sont délimitées à l'aide d'un curseur et leur surface mesurée par l'ordinateur. Nous déterminons également la surface de l'hémisphère droit et de l'hémisphère gauche
20 afin d'évaluer l'œdème cérébral pour chacune des coupes frontales digitalisées. Les surfaces de nécrose mesurées sont alors corrigées en fonction de cet œdème (c'est-à-dire multipliées par le rapport de la surface de l'hémisphère droit sur la surface de l'hémisphère gauche). Le volume de l'infarctus pourra alors être calculé en fonction des valeurs de surfaces de nécrose corrigées et de la distance séparant
25 chacun des niveaux de coupe.

L'œdème est calculé de la façon suivante: (surface de l'hémisphère gauche - surface de l'hémisphère droit / surface de l'hémisphère droit)

30

2. INJECTION INTRACEREBROVENTRICULAIRE CHEZ LE RAT

La voie d'administration choisie pour l'étude de l'effet des oligonucléotidiques antisens anti-NOS inductible a nécessité la mise en place d'un guide, 5 jours avant le
35 premier traitement (Figure 4).

2.1. Mise en place du guide

Un guide d'une longueur de 8 mm, réalisé à partir d'une aiguille de calibre
5 25G (Terumo®), est fixé sur le micromanipulateur d'un appareil stéréotaxique (David Kopf®, établissement Roucaire).

Les rats sont anesthésiés par l'hydrate de chloral (400 mg/kg. i.p.) puis placés
en contention stéréotaxique. La surface du crâne est rasée et une incision est effectuée
10 de manière à découvrir la boîte crânienne; le *calvarium* est dégagé. Un orifice est
perçé à la verticale du ventricule gauche selon les coordonnées déterminées à l'aide
de l'Atlas Paxinos et Watson (1986):

- Antéro-postériorité: 0,8 mm par rapport au bregma
- 15 -Latéralité: 1,5 mm par rapport au bregma.

Le guide est ensuite amené à l'aide du micromanipulateur à la surface de la
dure-mère de manière à induire le moins possible de lésion.

20 On fixe ensuite le guide à la boîte crânienne par du ciment dentaire (AP9,
AtlanticCodental) et deux vis d'ancrage. On peut alors détacher le guide du
micromanipulateur. L'animal est retiré de l'appareil stéréotaxique et remis dans des
conditions normales de stabulation à l'animalerie.

25 2.2. Protocole d'injection des oligonucléotides antisens anti-NOS inductible

Les antisens anti-NOS inductible ont été synthétisés à l'aide d'un synthétiseur
automatique. Les traitements débutent 5 jours après la mise en place du guide.
L'aiguille d'injection est constituée d'une aiguille dentaire de calibre 30G (Sofijet®),
30 sur laquelle un butoir, constitué d'un tronçon d'aiguille de calibre 23G (Terumo®) a
été préalablement collé à l'aide de colle de type cyanolit®, à 11 mm de l'extrémité du
biseau de l'aiguille dentaire. De cette manière, lorsque l'aiguille est enfoncée dans son
guide jusqu'au butoir, le milieu de son biseau se trouve à 3,5 mm de la surface du
crâne, ce qui d'après l'Atlas de Paxinos et Watson (1986) correspond au centre du
35 ventricule.

EXEMPLES

EXEMPLE A : Administration des oligonucléotides antisens de l'invention

5 Les oligonucléotides sont administrés en solution dans du liquide céphalorachidien artificiel (Dulbecco, Sigma, réf. D8662) à une concentration de 1 nmole/ μ l. Trois nanomoles des différentes séquences (SEQ ID n°1 et n° 2) sont injectés sous un volume de 3 μ l en 2 minutes à l'aide d'une pompe à perfusion (débit de 1,5 μ l/min), 12 heures avant l'ischémie, juste avant l'ischémie, puis toutes les 12
10 heures jusqu'à l'euthanasie des animaux, 3 jours après l'ischémie. Les animaux servant de témoins pour le solvant reçoivent, selon le même protocole, une injection de liquide céphalorachidien artificiel.

La séquence antisens (AS) ou oligonucléotide antisens, sa séquence contrôle
15 ou le solvant sont administrés selon le protocole décrit précédemment. Trois jours après l'ischémie, les animaux sont euthanasiés et leur cerveau est prélevé et coupé en 7 sections coronales de 2 mm d'épaisseur à l'aide d'une matrice. La quatrième coupe est isolée et disséquée sur de la glace. Au niveau de cette coupe, un échantillon contenant à la fois l'infarctus cortical (excepté la zone du clip) et l'infarctus striatal est
20 prélevé et congelé à -40°C pour le dosage des activités NOS et de la production de nitrotyrosine. Ces dosages sont aussi réalisés chez des animaux témoins-opérés, mais non-traités, et chez des rats témoins non-opérés. Les 6 autres coupes sont immergées dans une solution de TTC à 2% pour la mesure des surfaces d'infarctus. Malgré l'absence de la quatrième coupe, le volume total de l'infarctus peut être déterminé,
25 puisque la surface de l'infarctus correspondant à la quatrième coupe, est identique à celle mesurée au dos de la troisième coupe.

EXEMPLE B : Effet de l'oligonucléotide antisens AS et de sa séquence contrôle 30 sur les atteintes histologiques et fonctionnelles

Le but de cet exemple est de démontrer une amélioration histologique et fonctionnelle par rapport à la séquence contrôle, par l'action de l'oligonucléotide de l'invention, mesurées au travers des paramètres indicateurs des atteintes
35 fonctionnelles et histologiques. Les traitements sont injectés par voie intracérébroventriculaire comme décrit dans l'exemple A (dose de 3 nmoles

(1nmole/ μ l) 12 heures avant l'ischémie, juste avant l'ischémie, puis toutes les 12 heures jusqu'à l'euthanasie des animaux, 3 jours après l'ischémie).

1) Volumes des infarctus

5

Trois jours après l'ischémie, les animaux témoins ayant reçu le solvant ont des volumes d'infarctus corticaux et striataux respectivement de 112 ± 7 et 42 ± 2 mm³. Ces volumes ne sont pas significativement modifiés par la séquence contrôle. Par contre, les rats traités par la séquence AS présentent des volumes d'infarctus corticaux réduits de 25 à 50 % par rapport à ceux des animaux traités par le solvant, et ceux des rats traités par la séquence contrôle. Les volumes des infarctus striataux ne sont pas significativement affectés ni par la séquence AS, ni par sa séquence contrôle. La réduction de l'infarctus s'exerce aux niveaux des sections comprises entre 11,7 et 9,7 mm par rapport à la ligne inter-aurale, ce qui correspond à la partie antérieure de l'infarctus.

15

2) Score neurologique

Les animaux témoins-opérés ont un score neurologique égal à 5 pour les côtés gauche et droit. L'ischémie induit un déficit neurologique marqué du côté droit. Le traitement par la séquence contrôle ne modifie pas ce déficit neurologique. En revanche, le traitement par la séquence AS réduit significativement le déficit du côté droit par rapport à celui des animaux traités par le solvant, et par rapport à celui des rats traités par la séquence contrôle.

20

3) Perte de poids

L'évolution de la perte de poids au cours des jours qui suivent l'ischémie des animaux traités, soit par la séquence AS, soit par sa séquence contrôle, soit par le solvant a été mesurée ainsi que chez des animaux témoins-opérés.

30

Les animaux témoins-opérés perdent en moyenne 7 grammes pendant les deux jours après l'intervention, puis ils retrouvent leur poids initial. Après l'ischémie, les animaux perdent en moyenne 36 ± 3 g le premier jour suivant l'intervention, 52 ± 2 g à 2 jours et 66 ± 3 g à 3 jours. Le traitement par la séquence contrôle n'affecte pas

35

cette chute progressive de poids. Par contre, les rats traités par la séquence AS présentent, 2 jours après l'ischémie, une perte de poids réduite comprise entre 10 et 30% par rapport à celles induites chez les animaux traités par le solvant ou chez les rats traités par la séquence contrôle. Trois jours après l'ischémie, la perte de poids n'est plus modifiée par le traitement par la séquence AS.

Par la mesure des différents paramètres ci-dessus, cet exemple démontre que les animaux traités par les oligonucléotides antisens présentent, 3 jours après l'ischémie, une réduction comprise entre 25 et 50 % des volumes de l'infarctus cortical et une amélioration marquée des performances sensorimotrices. Cet exemple a également permis de mettre en évidence que le traitement par la séquence contrôle de l'antisens n'exerce aucun effet, ni sur la taille des lésions ni sur les atteintes fonctionnelles. Cette absence d'effet de la séquence contrôle démontre bien que l'effet de l'oligonucléotide antisens n'est pas lié à une activité non spécifique, mais résulte de l'inhibition de la synthèse d'une NO-synthase inductible.

EXEMPLE C : Effet de l'oligonucléotide antisens AS et de sa séquence contrôle sur le dosage des activités NO-synthases

Le but de cet exemple est de démontrer que l'administration d'oligonucléotides antisens selon l'invention permet une réduction de l'activité NOS calcium-indépendante induite par l'ischémie.

Les activités NOS calcium-dépendante et calcium-indépendante des animaux traités, soit par la séquence AS, soit par sa séquence contrôle, soit par le solvant ont été évaluées ainsi que chez des rats témoins-opérés et chez des rats contrôles non-opérés.

1) Activité NO-synthase calcium-dépendante

L'ischémie induit une diminution de l'activité NOS calcium-dépendante par rapport aux animaux témoins-opérés et témoins non-opérés. Les traitements par la séquence AS et sa séquence contrôle sont sans effet sur cette activité.

2) Activité NO-synthase calcium-indépendante

L'ischémie induit une augmentation de l'activité NOS calcium-indépendante d'un facteur 6 à 10 par rapport aux animaux témoins-opérés et témoins non-opérés. Le traitement par la séquence contrôle ne modifie pas significativement cette activité. Par contre, le traitement par la séquence AS entraîne une réduction de 25 à 50 % de l'activité NOS calcium-indépendante induite par l'ischémie.

Les résultats de cet exemple démontrent que l'administration d'oligonucléotides antisens selon l'invention permet avantageusement de réduire l'activité NOS calcium-indépendante induite par l'ischémie dans les cellules nerveuses.

Ces résultats montrent en outre, que le traitement par l'antisens réduit entre 25 et 50 % l'activité NOS inductible trois jours après l'ischémie, alors que sa séquence contrôle est dépourvue d'effet significatif sur cette activité enzymatique. En revanche, l'antisens comme son contrôle ne modifie pas l'activité NOS constitutive. Ces données révèlent l'inactivité de la séquence contrôle et l'effet inhibiteur spécifique de l'antisens de l'invention sur la synthèse de la NOS 2. De plus, la réduction de l'activité NOS 2 associée à l'effet neuroprotecteur, observée chez les animaux traités par l'antisens, suggère que l'antisens exerce son effet bénéfique *via* l'inhibition de la synthèse de la NOS 2.

EXEMPLE D : Effet de l'oligonucléotide antisens AS et de sa séquence contrôle sur la production de nitrotyrosine

La production de nitrotyrosine des animaux traités, soit par la séquence AS, soit par sa séquence contrôle, soit par le solvant a été évaluée ainsi chez des rats témoins-opérés et chez des rats témoins non-opérés.

Trois jours après l'ischémie, la production de nitrotyrosine est augmentée d'un facteur 2 par rapport à celles des animaux témoins-opérés et témoins non-opérés. La séquence contrôle ne modifie pas cette production. En revanche, le traitement par la séquence AS réduit d'environ un tiers l'augmentation des quantités de nitrotyrosine induite par l'ischémie.

Cet exemple démontre l'effet de l'antisens de l'invention sur la production des peroxynitrites, les principaux métabolites toxiques du NO. Cette production a été évaluée par le dosage de la nitrotyrosine. Les résultats montrent que le traitement par l'antisens réduit d'environ 1/3 l'augmentation de la production de nitrotyrosine induite par l'ischémie, alors que la séquence contrôle n'exerce aucun effet significatif sur cette production.

De plus, il faut remarquer que l'importance de la réduction de la formation de peroxynitrites sous l'effet de l'antisens est du même ordre que l'inhibition de l'activité NOS inductible. Cette donnée semble indiquer que les peroxynitrites sont issus du NO produit par l'activation d'une NOS inductible. Ainsi, l'antisens en inhibant la synthèse d'une NOS inductible réduit la formation des peroxynitrites. Cet effet associé à la neuroprotection suggère en outre que les peroxynitrites sont responsables des effets délétères de l'activation d'une NOS inductible.

EXEMPLE E : Effet de l'oligonucléotide antisens AS et de sa séquence contrôle sur les variables physiologiques

Les variables physiologiques des animaux traités, soit par la séquence AS, soit par sa séquence contrôle, soit par le solvant ont été mesurées.

Les animaux témoins présentent des valeurs physiologiques de pression artérielle moyenne, pO_2 , pCO_2 , pH et température rectale qui ne sont pas modifiées ni par l'ischémie, ni par la reperfusion. Les traitements par la séquence AS et sa séquence contrôle sont sans effet sur ces variables physiologiques.

BIBLIOGRAPHIE

- 5 Margail, I., Parmentier, S., Callebert, J., Allix, M., Boulu, R.G. et Plotkine, M., Short therapeutic window for MK-801 in transient focal cerebral ischaemia in normotensive rats, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1996, 16: 107-113.
- 10 Margail, I., Allix, M., Boulu, R.G. et Plotkine, M., Dose- and time-dependence of L-NAME neuroprotection in transient focal cerebral ischaemia in rats, *Br. J. Pharmacol.*, 1997, 120 : 160-163
- 15 Iadecola, C., Zhang, F.Y., Casey, R., Nagayama, M. et Ross, M.E., Delayed reduction of ischaemic brain injury and neurological deficit in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene, *J. Neurosci.*, 1997, 17 : 9157-9164.
- 20 Parmntier, S., Böhme, G.A., Lerouet, D., Damour, D., Stutzmann, J.M., Margail, I. et Plotkine, M., Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents ischaemic brain injury, *Br. J. Pharmacol.*, 1999, 127 : 546-552.
- 25 Noiri, E., Peresleni, T., Miller, F., et Goligorsky, M.S., In vivo targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischaemia, *J. Clin. Invest.*, 1996, 97 : 2377-2383.
- 30 Peresleni, T., Noiri, E., Bahou, W. et Goligorsky, M.S., Antisense oligodeoxynucleotides to inducible NO synthase rescue epithelial cells from oxidative stress injury, *Am. J. Physiol.*, 1996, 270 : F971-F977.
- 35 Ding, M., Zhang, M., Wong, J.L., Rogers, N.E., Ignarro, L.J. et Voskuhl, R.R., Cutting edge : antisense knockdown of inducible nitric oxide synthase inhibits induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice, *J. Immunol.*, 1998, 160 : 2560-2564.
- 40 Bredt, D.S. et Snyder, S.H., Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87 : 682-685.
- 45 Förstermann, U., Pollock, J.S., Schmidt, H.H.H.W., Heller, M. et Murad, F., Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fraction of bovine aortic endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88 : 1788-1792.
- 50 Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R. et Snyder, S.H., Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrom P-450 reductase, *Nature*, 1991, 351 : 714-718

- Lamas, S., Marsden, P.A., Li, G.K., Tempst, P. et Michel, T., Endothelial nitric-oxide synthase : molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89 : 6348-6352.
- 5 Xie, Q.W., Cho, H.J., Calacay, J. Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Ding, A., Troso, T. et Nathan, C., Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophage. Science, 1992, 256 : 225-228.
- Nathan, C., nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, Faseb J., 1992, 6 :
10 3051-3064.
- Minc-Gollomb, D., Tsarfaty, I. et Schwartz, J.P., Expression of inducible nitric oxide synthase by neurons following exposure to endotoxin and cytokine. Br. J. Pharmacol., 1994, 112 : 720-722.
- 15 Tamura, A., Graham, D., McCulloch, I. et Teasdale, G.M., Focal cerebral ischaemia in the rat : 1 description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion, J. Cereb. Blood Flow Metab., 1981, 1 : 53-60.
- 20 Paxinos, G. et Watson, C., The rat brain in stereotaxic coordinates, 1986, Academic press, London.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'oligonucléotides antisens d'une isoforme inductible de la synthase du monoxyde d'azote (iNOS) pour la préparation d'un médicament destiné à la
5 prévention et le traitement de l'ischémie cérébrale.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les oligonucléotides antisens sont antisens pour tout ou partie de la NO-synthase inductible.
- 10 3. Oligonucléotides antisens tel que décrit selon la revendication 2, caractérisé en ce que la séquence des oligonucléotides correspond à la séquence présentée en SEQ ID N° 1 ou l'une des séquences dérivées.
- 15 4. Oligonucléotides antisens tel que décrit selon la revendication 2, caractérisée en ce que la séquence des oligonucléotides correspond à la séquence présentée en SEQ ID N° 2 ou l'une des séquences dérivées.
5. Oligonucléotides antisens tel que décrit selon la revendication 2, caractérisés en ce que la séquence des oligonucléotides comprend entre 10 et 30 mers.
20
6. Oligonucléotides antisens tel que décrit selon la revendication 2, caractérisée en ce que la séquence des oligonucléotides comprend entre 15 et 25 mers.
- 25 7. Composition caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un oligonucléotide antisens d'une isoforme inductible de la synthase du monoxyde d'azote pour la prévention et le traitement de l'ischémie cérébrale.
8. Vecteur comprenant dans son génome un acide nucléique codant pour les oligonucléotides antisens tel que décrit selon la revendication 1.
30
9. Vecteur selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur plasmidique.
- 35 10. Vecteur selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un virus recombinant.

11. Virus tel que décrit selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il est défectif.
12. Virus selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un adénovirus, un rétrovirus, un virus adéno-associé, un herpès virus, le virus de la vaccine .
- 5 13. Utilisation d'un vecteur tel que décrit selon l'une des revendications 8 à 12 pour la fabrication d'un médicament destiné à la prévention et le traitement de l'ischémie cérébrale.
- 10 14. Composition comprenant au moins un vecteur tel que décrit selon les revendications 8 à 12.
- 15 15. Médicament comprenant au moins un vecteur tel que décrit selon les revendications 8 à 12.
16. Médicament comprenant au moins un oligonucléotide antisens d'une isoforme inductible de la synthase du monoxyde d'azote pour la prévention et le traitement de l'ischémie cérébrale.

1/4

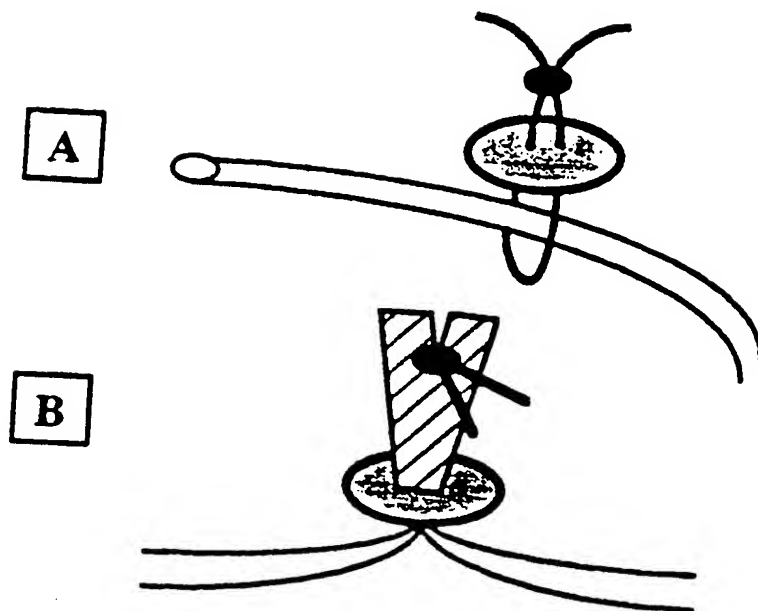


Figure 1

2/4

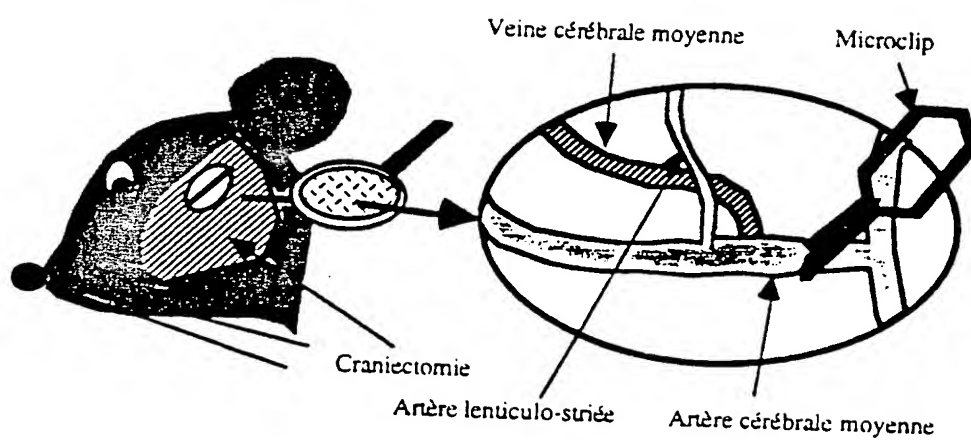


Figure 2

3/4

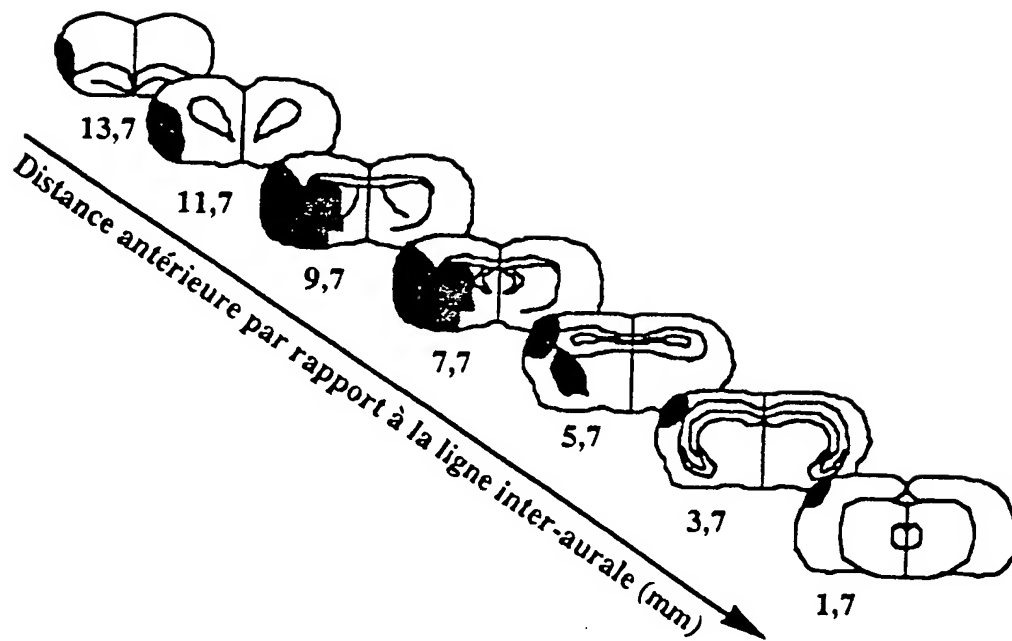


Figure 3

4/4

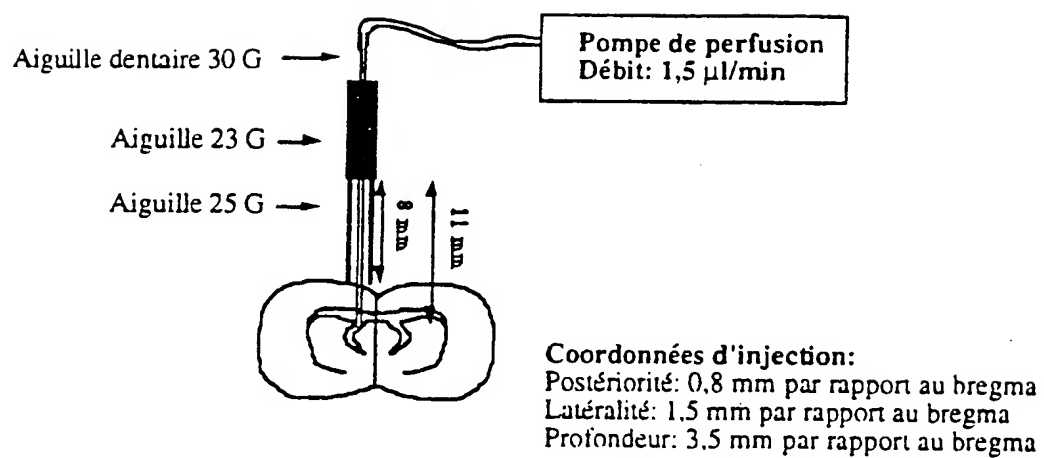


Figure 4

LISTE DE SEQUENCES

<110> RHONE-POULENC RORER SA

<120> UTILISATION D'OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS DE NO-SYNTASE
INDUCTIBLE DANS LA PREVENTION ET LE TRAITEMENT DE
L'ISCHEMIE CEREbraLE.

<130> sequences 1 et 2

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide antisens de iNOS

<400> 1

acaggccatc tctatggatt taca

24

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:oligonucléotide antisens de iNOS

<400> 2

cttcagagtc tgccattgc t

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/01191

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/11 A61K31/7125 C12N15/86 //A61P9/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 23038 A (WELLCOME FOUND ; MONCADA SALVADOR ENRIQUE (GB); CHARLES IAN GEORGE) 13 October 1994 (1994-10-13) page 6, line 6 - line 28	1,2,5-7, 16
Y	page 14, line 2 - line 17 claims 11-13,19	2,8-15
Y	WO 96 01902 A (RHONE POULENC RORER SA ; BOHME ANDREES (FR); BRANELLEC DIDIER (FR);) 25 January 1996 (1996-01-25) the whole document	2,8-15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 September 2000

Date of mailing of the international search report

19/09/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01191

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NOIRI, E. ET AL.: "In vivo targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia" J. CLIN. INVEST. (1996), 97, 2377-2383, XP002128096 cited in the application the whole document ---	1,4-7
X	PERESLENI T. ET AL.: "Antisense oligodeoxynucleotides to inducible NO synthase rescue epithelial cells from oxidative stress injury." AM J PHYSIOL 1996 JUN;270(6 PT 2):F971-7, XP000867070 cited in the application the whole document ---	1,3,5-7
X	ROSS ME. ET AL.: "Nitric oxide synthase expression in cerebral ischemia: neurochemical, immunocytochemical, and molecular approaches." METHODS ENZYMOL 1996;269:408-26, XP000867069 page 422 -page 426 ---	1,5-7
A	IADECOLA, C. ET AL.: "Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene" THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 17, 1 December 1997 (1997-12-01), pages 9157-9164, XP000867073 cited in the application the whole document -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter national Application No

PCT/FR 00/01191

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 9423038	A	13-10-1994	AU 6287894 A	24-10-1994
W0 9601902	A	25-01-1996	FR 2722507 A	19-01-1996
			AU 691008 B	07-05-1998
			AU 2930695 A	09-02-1996
			CA 2193263 A	25-01-1996
			EP 0770133 A	02-05-1997
			FI 970114 A	10-01-1997
			JP 10502533 T	10-03-1998
			NO 970048 A	07-01-1997
			ZA 9505797 A	26-02-1996

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Donn. internationale No
PCT/FR 00/01191

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/11 A61K31/7125 C12N15/86 //A61P9/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

Biosis, Chem ABS Data, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 94 23038 A (WELLCOME FOUND ; MONCADA SALVADOR ENRIQUE (GB); CHARLES IAN GEORGE) 13 octobre 1994 (1994-10-13) page 6, ligne 6 - ligne 28	1,2,5-7, 16
Y	page 14, ligne 2 - ligne 17 revendications 11-13,19	2,8-15
Y	WO 96 01902 A (RHONE POULENC RORER SA ; BOHME ANDREES (FR); BRANELLEC DIDIER (FR);) 25 janvier 1996 (1996-01-25) le document en entier	2,8-15

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 septembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

19/09/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Andres, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 00/01191

C. (suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	NOIRI, E. ET AL.: "In vivo targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia" J. CLIN. INVEST. (1996), 97, 2377-2383, XP002128096 cité dans la demande le document en entier	1,4-7
X	PERESLENI T. ET AL.: "Antisense oligodeoxynucleotides to inducible NO synthase rescue epithelial cells from oxidative stress injury." AM J PHYSIOL 1996 JUN;270(6 PT 2):F971-7, XP000867070 cité dans la demande le document en entier	1,3,5-7
X	ROSS ME. ET AL.: "Nitric oxide synthase expression in cerebral ischemia: neurochemical, immunocytochemical, and molecular approaches." METHODS ENZYMOL 1996;269:408-26, XP000867069 page 422 -page 426	1,5-7
A	IADECOLA, C. ET AL.: "Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene" THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 17, 1 décembre 1997 (1997-12-01), pages 9157-9164, XP000867073 cité dans la demande le document en entier	1-16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den e internationale No

PCT/FR 00/01191

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9423038 A	13-10-1994	AU 6287894 A	24-10-1994
WO 9601902 A	25-01-1996	FR 2722507 A	19-01-1996
		AU 691008 B	07-05-1998
		AU 2930695 A	09-02-1996
		CA 2193263 A	25-01-1996
		EP 0770133 A	02-05-1997
		FI 970114 A	10-01-1997
		JP 10502533 T	10-03-1998
		NO 970048 A	07-01-1997
		ZA 9505797 A	26-02-1996

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)